

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Síntese de derivados da xilose com potencial aplicação como agentes antimicrobianos

Patrícia Filipa Alves Serra

DISSERTAÇÃO

VERSÃO PÚBLICA

Mestrado em Química

Especialização em Química, Saúde e Nutrição

(Euromaster)

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Síntese de derivados da xilose com potencial aplicação como agentes antimicrobianos

Patrícia Filipa Alves Serra

Dissertação orientada por Prof. Dr. Amélia Pilar Rauter e por Dr. Dália Dias Barbosa

DISSERTAÇÃO

VERSÃO PÚBLICA

Mestrado em Química

Especialização em Química, Saúde e Nutrição

(Euromaster)

2012

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projecto FACIB, financiado pelo programa QREN – COMPETE (QREN – SI I&DT Co-Promoção Projecto n.º 21547)

AGRADECIMENTOS

Chega agora a altura de colher os frutos que brotaram das sementes outrora plantadas, muitos são aqueles que me auxiliaram nesta caminhada. Não tendo sido apenas isso, um trabalho, mas sim um crescimento, uma aprendizagem pessoal e profissional, uma caminhada, uma luta, uma vitória, torna-se prioritário prestar os meus agradecimentos a todos os contribuíram e que fizeram a diferença nesta jornada.

Primeiramente, quero agradecer à professora e minha orientadora, a Professora doutora Amélia Pilar Rauter, por me ter dado a oportunidade de fazer este trabalho, por me ter ensinado e me ter ajudado a crescer com este desafio. Agradeço também à Doutora Dália Barbosa pela sua orientação, a sua pronta disponibilidade, simpatia e confiança em mim depositada. Aproveito também para agradecer a oportunidade de ter trabalhado na CIPAN e a todos aqueles que tão bem me receberam a auxiliaram.

Agradeço à Professora Doutora Maria Soledade Santos pela sua disponibilidade em permitir o estudo da tensão superficial dos compostos, dado ser um importante contributo para este trabalho. A sua simpatia, auxílio e presteza foram por mim recebidas com enorme carinho.

Pela contribuição dada neste trabalho, e projecto em que está inserido, agradeço ao doutor Ricardo Dias e aos elementos do *BioFig*. O estudo das actividades biológicas é de maior importância e por tal agradeço também ao meu colega João Pedro Pais pela sua contribuição.

Ao grupo de Espectrometria de Massa, com especial destaque ao Doutor Paulo Madeira, Ana Rita Gomes e Tiago Jorge muito agradeço as análises para a caracterização dos meus compostos e a sua pronta disponibilidade e simpatia.

Agradeço à Professora Doutora Maria José Brito pelo seu auxílio na interpretação dos espectros de RMN de flúor.

Para ter conseguido alcançar esta meta muito devo também ao grupo onde estou inserida, o grupo de Química dos Glúcidos. “Pelos momentos “docinhos” que passei e espero vir a passar e por todos os ensinamentos que me deram.” Esta foi a frase usada como agradecimento no meu projecto final de licenciatura, a qual mantenho. Tudo o que me ensinaram, os momentos proporcionados, muitos deles que perdurarão na memória, fases que ultrapassámos, as pessoas que conheci, os amigos que fiz, o apoio que tive e tudo o mais que levou a esta nossa equipa merece, sem dúvida, o meu grande obrigada. Vários são os nomes aqui inseridos, Daniela, Diana, Stefan, Nuno, João, entre outros, mas acreditem que todos vós têm um lugar no meu coração, por isso a todos vós, muito obrigada.

À Dr.^a Alice dou o meu agradecimento pela sua grande simpatia, carinho, dedicação a todos nós e o seu enorme cuidado. A sua presença é fundamental para todos nós.

Este mestrado é mais uma etapa que alcanço na minha história e há amigos que são essenciais para tal também e para torná-la mais significativa.

Rita, minha madrinha e amiga, muito obrigada pela tua amizade e por tudo. Sabes que muito me ajudaste a aprender, a crescer e a sorrir, muito me ensinaste, mesmo em alguns momentos sem te aperceberes. O teu apoio em todos os momentos é fundamental e essencial.

Vasco a ti te agradeço a tua presença e amizade e por me teres deixado conhecer a grande pessoa que és. Como já te disse, foste e és muito importante nesta caminhada. Contigo muito aprendi e a tua presença permitiu-me chegar aqui com tudo o que me transmitiste, apoio, força, alento, conselhos e ensinamentos. E retenho em mim a frase que disseram a mim e a ti: “Este é o vosso ano”. Por isso espero que este ano venham muitos triunfos, todos os que mereces e que digas “eu consegui”.

Filipa, a minha querida afilhada obrigada pela tua presença e grandeza, obrigada por ter podido conhecer neste ano e termos criado a nossa amizade, acredita que és muito importante e responsável por vários dos ensinamentos que tive. O teu apoio foi muito querido para mim. À Ana Catarina agradeço também a sua presença e a sua entrada para este grupo. A tua animação e simpatia demonstram tanto de ti. A amizade que vi crescer é para mim muito querida, és um grande apoio nesta caminhada.

Vanessa e Catarina muito obrigada por tudo, a nossa amizade muito contribuiu, em todos os momentos, para que pudesse fazer esta caminhada e torná-la mais colorida e significativa. Vanessa o que melhor nos define é que a distância não é impedimento para que a amizade nos encha o coração. Catarina obrigada por tudo e pela tua presença. Andreia, Bia, Rita, Sofia, Isabel e Tiago agradeço a vossa presença e apoio e por darem cor aos meus dias.

Por último, mas o mais importante, agradeço à minha família. Mãe, Pai e Mano, sem o vosso apoio, força e sustento, como meus pilares, não poderia aqui ter chegado. Obrigada por tudo não chega para demonstrar tudo e evidenciar a vossa importância, a vós vos dedico este meu trabalho. Por tudo o que me apoiaram e por estarem sempre do meu lado estarei sempre agradecida. Porque tenho muita sorte em vos ter e fazerem parte de mim. Aos meus avós tenho também muito a agradecer, por toda a preocupação, fazerem parte da minha vida, estarem sempre do meu lado e olharem por mim, estejam onde estiverem. Obrigada!

A todos vocês muito obrigada, cada um com as suas características fizeram este meu caminho muito melhor, e nem sempre chegam as palavras para o mostrar.

“Há gente que fica na história da história da gente.” Por tudo e pela vossa inspiração em cada dia.

ABSTRACT

The main goal of this research consisted on the synthesis of a new family of alkyl 2-deoxy pentopyranosides, with a structure exhibiting the deoxygenation pattern of previously studied alkyl hexopyranosides that have shown a promising activity against pathogenic *Bacillus* species.

The target compounds are alkyl 2-deoxy-D-*threo*-pentopyranosides and three different alkyl chains will be introduced: a dodecyl, a decyl and a fluorinated decyl chain. These structural features may give insights onto the relationship between structure, surface activity and bioactivity of this family of compounds regarding *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis* and contribute to the study of their mechanism of action. A preliminary investigation of the antibacterial activity on *B. cereus* showed that the most promising compound is dodecyl 2-deoxy- α -D-*threo*-pentopyranoside. Hence, its surface activity and its industrial scale up were also investigated.

An underlying goal was the development of an easier and economical synthesis of the glycal used as glycosyl donor of the glycosylation reaction. For the purpose a strategy based on acetylation of D-xylose, followed by anomeric bromination and reductive elimination reaction was used to give 3,4-di-*O*-acetyl-D-xylal. For the synthesis of the glycosyl bromide, two different approaches were tested and the experimental conditions optimized. The glycosylation reaction was carried out with three different nucleophiles, namely dodecanol, 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-nonadecafluorodecanol and decanol, in the presence of an acid catalyst. The structure of the synthesized compounds was characterized by NMR including bidimensional techniques COSY, HMBC and HMQC when necessary, and mass spectrometry was also used to confirm compounds' mass.

Keywords

alkyl 2-deoxy glycosides
Bacillus sp.
Carbohydrate-based antibiotics
Surface activity
Scale up

RESUMO

O principal objectivo da presente investigação consistiu na síntese de 2-desoxipentopiranosídeos de alquilo, com uma estrutura análoga a compostos previamente sintetizados, que se revelaram promissores contra espécies de *Bacillus* patogénicas. Os compostos-alvo são denominados 2-desoxi-D-*treo*-pentopiranosídeos de alquilo. As diferenças estruturais aqui inseridas consistem na introdução da série D e no estudo de pentopiranosídeos. Pretende-se estudar, futuramente, a relação estrutura/bioactividade deste grupo de compostos relativamente às bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus anthracis* e contribuir para o estudo do seu mecanismo de acção. Dos compostos sintetizados seleccionou-se o mais promissor a nível biológico, o 2-desoxi- α -D-*treo*-pentopiranosídeo de dodecilo, e analisaram-se as suas propriedades tensioactivas. Submeteu-se também este composto a estudos de *scale up* a nível industrial.

Um objectivo subjacente consistiu no desenvolvimento de um método mais económico e simples de síntese do glicol utilizado como dador de glicosilo na reacção de glicosilação. Para tal, desenvolveu-se uma via sintética baseada na protecção da D-xilose com grupos acetilo, seguindo-se a bromação anomérica e posterior eliminação redutiva com formação de 3,4-di-O-acetil-D-xilal. Para a síntese do brometo de glicosilo ensaiaram-se duas vias sintéticas distintas, o que conduziu à optimização das condições experimentais de síntese. A reacção de glicosilação foi realizada com três nucleófilos diferentes, nomeadamente o dodecanol, o 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-nonadecafluorodecanol e o decanol, utilizando um catalisador ácido. Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por RMN utilizando, sempre que necessário, as técnicas bidimensionais *COSY*, *HMBC* e *HMQC*. A Espectrometria de massa foi usada para confirmar a massa dos compostos.

Palavras-chave:

2-Desoxiglicósidos de alquilo

Bacillus sp.

Antibióticos derivados de açúcares

Tensão superficial

Scale up

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	1
ABSTRACT.....	3
RESUMO	5
ÍNDICE GERAL.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE ESQUEMAS	9
ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE ANEXOS.....	11
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Aspectos Estruturais	4
1.2 Glicósidos	7
1.2.1 Glicósidos de alquilo – 2-desoxiglicósidos de alquilo.....	8
1.3 Actividade Biológica - Antimicrobianos	10
1.3.1 Glicósidos como antibióticos	11
1.3.1.1 Glicósidos como surfactantes	12
1.3.2 Antrax – <i>Bacillus anthracis</i>	13
1.4 Tensão superficial	15
1.4.1 Medição da Tensão superficial.....	16
1.4.2 Surfactantes	17
1.5 Plano de Síntese (Confidencial).....	19
2 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS (CONFIDENCIAL).....	23
3 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS (CONFIDENCIAL).....	27
4 PARTE EXPERIMENTAL	31
4.1 Materiais e Métodos.....	31
4.1.1 Instrumentação	31
4.1.2 Técnicas de Separação e purificação.....	32
4.1.3 Reagentes, Produtos e Solventes.....	32
4.2 Síntese dos Compostos Estudados (Confidencial).....	32
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Exemplo de monossacáridos: treose, xilose e glucose.....	5
Figura 2 Ilustração de estruturas de configuração <i>treo</i>	5
Figura 3 Atribuição de configuração anomérica α e β	6
Figura 4 (a) α -D-glicósido de metilo e (b) β -D-glicósido de metilo	7
Figura 5 Estrutura de um glicósido alvo desta investigação	8
Figura 6 Vancomicina: antibiótico derivado de um glicósido [17]	10
Figura 7 Exemplo de um glicósido surfactante	12
Figura 9 Esquema ilustrativo das forças de interacção entre as moléculas no líquido e da força tangencial à superfície	15
Figura 8 Bola de sabão e água.....	15

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Não foi encontrada nenhuma entrada do índice de ilustrações.

ÍNDICE DE TABELAS

Não foi encontrada nenhuma entrada do índice de ilustrações.

ÍNDICE DE ANEXOS

Não foi encontrada nenhuma entrada do índice de ilustrações.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
δ	Desvio químico
η	Rendimento
Å	Angström
$[\alpha]_D^{20}$	Rotação específica
Ac	Acetilo
Ac ₂ O	Anidrido Acético
Ace	Acetona
AcOEt	Acetato de Etilo
AcOH	Ácido Acético
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido Acético
Brs	<i>Broad</i> singleton
Brt	<i>Broad</i> tripleto
Brq	<i>Broad</i> quarteto
Bn	Benzilo
BnBr	Brometo de Benzilo
C.C.	Cromatografia em coluna
Cyhex	Ciclohexano
CIM	Concentração inibitória mínima
CMC	Concentração micelar crítica
<i>COSY</i>	<i>Correlated Spectroscopy 2D NMR</i>
¹³ C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
DCM	Diclorometano
DMAP	4-dimetil-aminopiridina
d	Dubleto
dd	Dubleto duplo

ddd	Duplo dubleto duplo
dim	Dimensão
eq.	Equivalentes
Et.P.	Éter de petróleo
Hex	Hexano
¹ H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
h	Horas
Hep	Heptano
<i>HMBC</i>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<i>HMQC</i>	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence 2D</i>
<i>HRESIMS</i>	High resolution electrospray ionization mass spectrometry
Hz	Hertz
J	Constante de Acoplamento
m	Multiplete
min	minutos
ml	mililitro
mmol	milimol
MeONa	Metóxido de Sódio
MeOH	Metanol
MW	micro-ondas
Ph	Fenilo
ppm	partes por milhão
Py	Piridina
Ref.	Referência
R _f	Factor de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rpm	Rotações por minuto
s	Singuleto

t	Tripleto
t.a.	temperatura ambiente
td	triplete duplo
TBAI	Iodeto de tetrabutílamónio
THF	Tetrahidrofurano
<i>TLC</i>	<i>Thin layer chromatograph</i>
Tol	Tolueno
TPPHB	Hidrobrometo trifenílfosfónio
UV	Ultra-violeta

1|INTRODUÇÃO

1 | INTRODUÇÃO

A presente dissertação insere-se na área de química dos glúcidos ou dos carbo-hidratos, dois termos considerados sinónimos. Desde o início do século XIX que os carbo-hidratos têm sido objecto de investigação nas diferentes valências científicas levando a sua aplicação nos mais variados campos, dado que a sua estrutura permite uma ampla funcionalização. Adicionalmente, a sua origem natural, a sua elevada abundância e o seu importante papel em diferentes processos biológicos engrandece a sua potencialidade de aplicação nas áreas da química e afins, principalmente na química medicinal. É de referir que os glúcidos constituem a classe mais abundante de biomoléculas, sendo essenciais ao suporte da vida. A sua designação inicial de carbo-hidratos deve-se à origem no nome alemão *Kohlenhydrate*, sendo inicialmente utilizada para referir os compostos de fórmula empírica “ $C_nH_{2n}O_n$ ” dado que, originalmente, se defendia que a sua estrutura era constituída por hidratos de carbono, e portanto constituídos por átomos de carbono, hidrogénio e oxigénio. Actualmente denota-se a extensão que este termo sofreu, compreendendo compostos derivados de monossacáridos através de várias funcionalizações, tais como a redução do grupo carbonilo da posição anomérica (alditóis), oxidação de um ou mais grupos terminais, substituição de um ou mais grupos hidroxilo por átomos de hidrogénio, grupos amino ou tio ou grupos heteroatómicos semelhantes. Os maiores desafios associados a estas transformações prendem-se com a regio- e estereosselectividade e com a protecção e desprotecção selectiva dos grupos devido às suas diferentes reactividades [1,2].

O papel dos carbo-hidratos tem evoluído ao longo dos tempos. No passado, estes eram encarados de uma forma mais simples, sendo moléculas de armazenamento e transporte de energia e sendo componente estrutural, nomeadamente a celulose e quitina em que aqui se apresentam na forma de polissacáridos. Com o aprofundar do conhecimento destas moléculas verificou-se a sua importância biológica, como a sua capacidade de ligação a outras moléculas, e concluiu-se que estas eram essenciais à vida em vários processos biológicos tais como, por exemplo, o reconhecimento e interação na membrana celular. Existem assim factos crescentes que engrandecem a importância dos hidratos de carbono [1]. O aumento da compreensão da química e bioquímica desta classe de moléculas leva à sua incorporação em diferentes campos da nossa sociedade, para além do seu papel biológico. Pode-se assim afirmar que para além da sua primazia nos processos biológicos, a sua capacidade de transformação a nível químico leva à sua conversão em compostos de interesse alimentar, agroquímico, industrial e farmacêutico. Um dos mais importantes objectivos consiste na incorporação de novos fármacos no mercado e verificação da sua eficácia contra os mais

variados tipos de patologias. Um outro objectivo consiste na descoberta e síntese de novas moléculas baseadas em carbo-hidratos com propriedades melhoradas em termos de estabilidade, selectividade e disponibilidade [3].

Emil Fisher foi considerado como pai da química dos carbo-hidratos, devido ao seu legado no estudo dos carbo-hidratos e no desvendar das estruturas de vários açúcares bem como na sua interpretação da estereoquímica e também na nomenclatura que introduziu no início do século XX, ainda hoje em pleno uso. A evolução das técnicas espectroscópicas e de purificação levou a um outro passo importante no crescimento do conhecimento dos carbo-hidratos, desde os mais simples até aos glicoconjugados mais complexos levando a que actualmente este seja um importante ramo da química [4].

1.1| Aspectos Estruturais

Sendo os termos “carbo-hidratos” e “glúcidos” tão largamente aplicados, torna-se primordial compreender o conceito a que se referem. Glúcidos é um termo sinónimo de “carbo-hidratos” ou de “hidratos de carbono”, que abrange um vasto grupo de compostos, que incluem os monossacáridos, oligossacáridos, polissacáridos e os seus derivados após modificações químicas. O termo “açúcar” é menos abrangente, refere-se a monossacáridos e oligossacáridos de baixa massa molecular. Monossacárido, tal como o nome indica, é a unidade básica, diz respeito a uma única unidade molecular que não possui ligações (glicosídicas ou outras) a outro monossacárido [4].

Existem alguns aspectos estruturais relativos aos monossacáridos que se torna importante clarificar e que se tornam relevantes aquando da nomenclatura destes compostos. Uma das estruturas tipo dos monossacáridos é a aldose, que consiste numa cadeia linear de átomos de carbono poli-hidroxilada com um grupo aldeído em C-1, exemplificada com a treose, a xilose e a glucose, cuja projecção de Fischer é apresentada na figura 1. Uma das características mais relevantes consiste na presença de um centro estereogénico em cada carbono ligado a um álcool secundário dando origem a estereoisómeros, cujo número pode ser muito elevado, conforme o número de centros estereogénicos presente na molécula [2]. A alteração da orientação dos grupos nos centros estereogénicos leva à formação dos diastereoisómeros ou de enantiómeros [2].

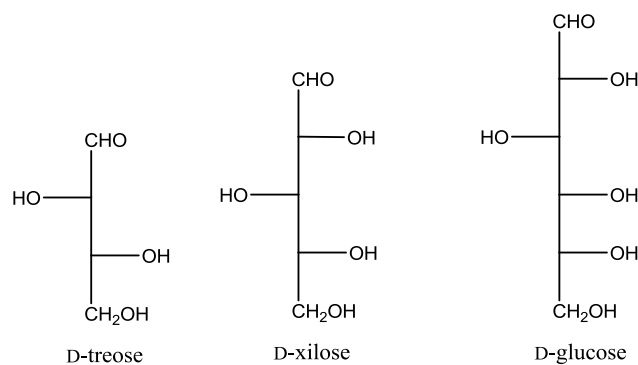


Figura 1 | Exemplo de monossacáridos: treose, xilose e glucose.

A tetrose (possui 4 átomos de carbono na cadeia) indicada na figura 1 designa-se treose, à qual corresponde o prefixo *treo* característico de dois centros estereogénicos que possuem a configuração acima indicada na projecção de Fischer, na qual os dois grupos hidroxilo estão orientados para sentidos opostos. Se os dois grupos hidroxilo estivessem projectados para o mesmo lado na projecção de Fischer, o composto seria a eritrose e o prefixo seria *eritro*. Outros exemplos de derivados que possuem a configuração *treo* estão indicados na Figura 2a, e consistem em derivados desoxigenados da D-glucose e da D-xilose, respectivamente. As duas estruturas apresentadas são bastante importantes, dado constituírem um exemplo de uma hexose e de uma pentose, respectivamente. A D-glucose é dos açúcares mais utilizados na área dos carbo-hidratos, no entanto, a presente investigação centra-se na D-xilose, como composto de partida.

Tendo como referência a projecção de Fischer, esta remete para uma outra importante característica destes compostos: a série D ou L. Os açúcares dividem-se entre estas duas categorias que são ditadas pela configuração absoluta do centro estereogénico mais afastado da função cetona ou aldeído, no caso de ter configuração *R* pertence à série D, caso se tratar de configuração *S* pertence à série L. Na figura 2, as moléculas pertencem à série D. [4]

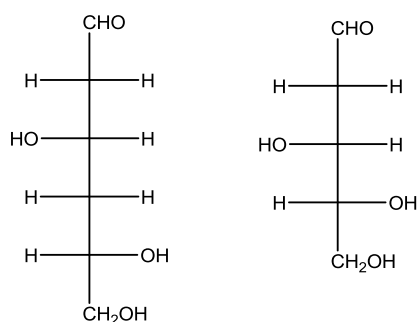


Figura 2 | Ilustração de estruturas de configuração *treo*

O açúcar tende a converter-se na conformação mais estável, que não sendo a aberta tende a ciclizar. A reacção de formação do ciclo dá-se entre o grupo aldeído e um álcool da cadeia entrando em equilíbrio entre a forma aberta e a forma cíclica, com formação de um hemiacetal intramolecular. A ciclização origina um novo centro estereogénico, devido à reacção do álcool com o aldeído, denominado de posição anomérica, e posicionado em C-1. Conforme se dê o ataque nucleófilo do grupo hidroxilo ao carbono carbonílico, assim se forma um de dois anómeros, α ou β . Dada a presença de vários grupos hidroxilo, a molécula pode ciclizar em anéis de vários membros, sendo mais estáveis os anéis de cinco e de seis membros. A atribuição de anómero α ou β faz-se através da orientação *trans* ou *cis* do grupo hidroxilo ou substituinte anomérico e a ligação ao átomo de oxigénio do ciclo na projecção de Fischer (figura 3). [1,4]

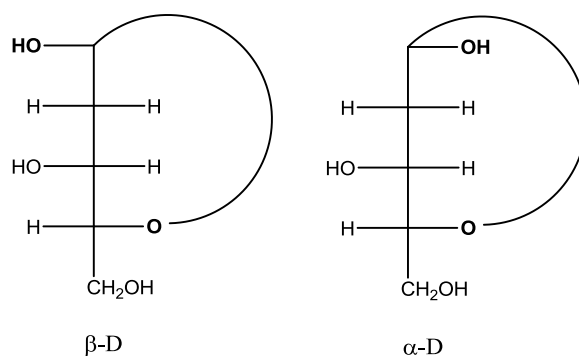


Figura 3 | Atribuição de configuração anomérica α e β

1.2| Glicósidos

A função hemiacetal permite, na presença de um ácido de Lewis como catalisador, reagir com um álcool para sintetizar um glicósido (glicosidação de Fischer). Os glicósidos são acetais formados por eliminação de uma molécula de água por reacção de um hemiacetal com um álcool. Esta é a síntese descrita mais simplificada de formação de glicósidos. A ligação glicosídica permite ligar um açúcar a outra molécula com um grupo hidroxilo, em que uma das moléculas actua como dador de glicosilo e a outra como aceitador de glicosilo. A ligação glicosídica pertence a uma função acetal e é consequentemente estável em meio básico e instável em meio ácido. Este tipo de derivatização tem variadas aplicações a nível químico e biológico, aumentando o vasto leque de possíveis compostos a sintetizar. A investigação associada a este grupo de compostos tem demonstrado a sua grande aplicabilidade, a nível químico, biológico e medicinal. A sua síntese tem sido desenvolvida por variadas metodologias. No entanto os químicos continuam a desenvolver novos compostos promissores e novas metodologias para a sua preparação. A grande maioria dos métodos conhecidos necessita de compostos de partida com os seus grupos hidroxilo selectivamente protegidos. Na figura 1 apresenta-se a estrutura de dois glicósidos conhecidos mais simples. [5 a 8]

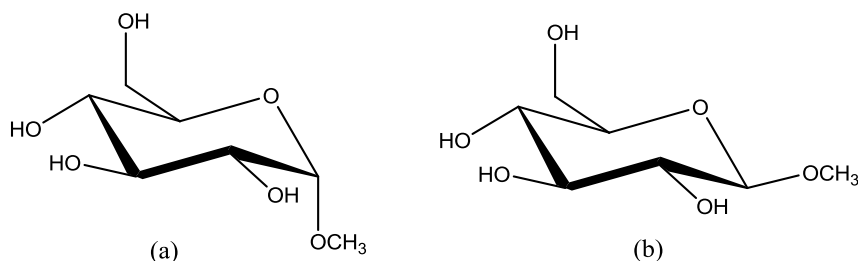


Figura 4| (a) α -D-glicósido de metilo e (b) β -D-glicósido de metilo

Para se efectuarem transformações nos glicósidos ou nos seus precursores é prioritário analisar-se as diferentes reactividades associadas aos grupos da molécula alvo e da mesma que se pretende trabalhar. Há que se ter em conta os conceitos de regioselectividade e estereoselectividade dos compostos e dos possíveis métodos de síntese. O uso de grupos protectores é uma importante ferramenta para que se consiga contornar alguns problemas de reactividade existentes. Dependendo da posição em que se pretende efectuar a reacção assim se deve escolher o grupo protector, tendo em conta a reactividade das restantes posições. Os grupos protectores devem obedecer a um certo número de critérios, tal como serem facilmente aplicáveis, estáveis nas reacções seguintes mas que permitam uma fácil eliminação sob

correctas condições. [1] Um dos métodos mais aplicados é a acetilação, originando a protecção sob a forma de ésteres, dado que são fracos nucleófilos, mais apolares e estáveis num elevado espectro de condições reaccionais. [2] Um outro método de protecção que será analisado nesta investigação é a benzilação, em se protege o hidroxilo sob a forma de um éter que se torna mais estável quando comparando com a protecção com grupos acilo. [9]

1.2.1| Glicósidos de alquilo – 2-desoxiglicósidos de alquilo

Os compostos-alvo deste trabalho são glicósidos de alquilo, que apresentam a glícóna derivada de um açúcar ligada a uma cadeia alquílica derivada de um álcool, nucleófilo da reacção de glicosilação. A sua estrutura caracteriza-se por apresentar a unidade glucídica, originando a cabeça hidrofílica do composto, ligada à aglícóna, que origina a cauda hidrofóbica da molécula, sendo esta uma estrutura tipo de um surfactante (fig. 5).

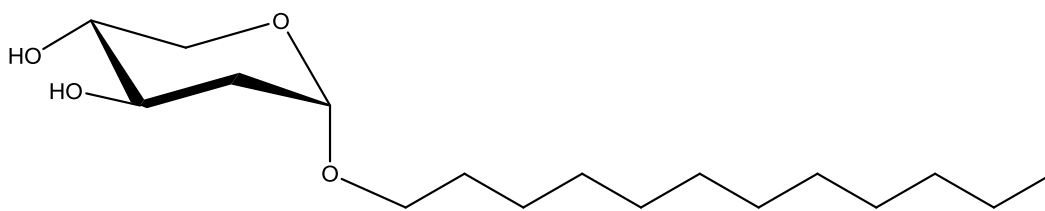


Figura 5| Estrutura de um glicósido alvo desta investigação

Os glicósidos presentemente abordados são do tipo 2-desoxiglicósidos com uma ligação glicosídica a uma cadeia de alquilo. Esta alteração estrutural leva a uma modificação das propriedades surfactantes da molécula dado que se retira um grupo hidroxilo (polar) dando origem a uma posição mais apolar, o que aumenta a componente lipofílica da molécula. Esta modificação estrutural altera também a tendência de agregação das estruturas deste tipo alterando assim a concentração a que se formam as micelas, arranjos espaciais resultantes das propriedades surfactantes aqui referidas.

Os 2-desoxiglicósidos são componentes estruturais de compostos bioactivos bastante conhecidos com diferentes actividades, sendo por exemplo, antitumorais e antibióticos. A sua síntese é habitualmente efectuada a partir do precursor glicopiranosídeo 1-2 insaturado, sendo glical o nome trivial. [11,10,12,13]

Presentemente o nosso grupo de investigação está envolvido no estudo desta família de compostos com o objectivo de desenvolver novos antibióticos com aplicação contra espécies de *Bacillus*, sendo o alvo primário o *Bacillus anthracis*. Pretende-se criar uma biblioteca de

compostos para se efectuarem estudos de mecanismos de acção e se poderem realizar estudos de relação estrutura/actividade podendo assim determinar quais os grupos da molécula que potenciam a sua actividade, isto é, avaliar de que modo o padrão de desoxigenção do açúcar, a série D ou L a que pertence, e a cadeia alifática ligada a este influenciam a acção biológica contra os *Bacillus*. Os resultados prévios enfatizam os derivados que apresentam a cadeia de doze carbonos ligada ao anómero α , os quais possuem uma maior solubilidade face ao correspondente anómero β . A existência de grupos hidroxilo livres no açúcar são determinantes para a actividade dado que quando protegidos não apresentam actividade, referenciando para o equilíbrio hidro- e lipofílico pelo que a cadeia alifática é também determinante. Em geral, a reacção de glicosilação aqui descrita dá-se entre um dador de glicosílo, o glical (nome trivial) e um nucleófilo, álcool de cadeia alifática, catalisada pelo ácido de Lewis hidrobrometo de trifenilfosfano. Desta reacção formam-se ambos os anómeros α e β , com maior prevalência para o anómero α devido ao efeito anomérico. Este efeito estereoelectrónico resulta da maior estabilidade quando o substituinte anomérico é electronegativo e se encontra em posição axial, o que permite a doação parcial do par de electrões livre (na orbital n) do oxigénio do anel para a orbital anti-ligante σ^* da ligação anomérica (C-X). [5,6,14]

É de referir que os compostos sintetizados na presente investigação são derivados da D-xilose, pelo que numa primeira abordagem se efectuou a síntese do precursor xilal (nome trivial), 3,4-di-O-acetil-D-xilal (IUPAC: 1,5-anidro-3,4-di-O-acetyl-2-deoxy-D-*threo*-pent-1-enitol) dando seguidamente a treopiranósidos de alquilo. Aqui se apresenta a introdução de uma nova componente hidrofílica na busca de compostos biologicamente activos aqui descrita. Isto é, dá-se aqui primazia ao estudo da estrutura de pentopiranósidos em que o grupo metilo ou hidroximetilo na posição 5 é substituído por um hidrogénio.

Na literatura existem variadas aplicações para glicósidos, sendo de destacar a aplicabilidade com anticancerígenos. Abrahamsson e colaboradores descreveu que as cadeias de glicosaminoglicanas, ancoradas a proteoglicanas (estruturas extracelulares da membrana celular) estão inseridas em importantes interações entre células, sendo que a sua biossíntese envolve a presença de xilósidos ligados a estruturas hidrofólicas (xilonaftalósidos ligados a aminoácidos). A aplicação destes compostos levou a uma acção antiproliferativa. [15,16]

1.3| Actividade Biológica - Antimicrobianos

Um dos grandes objectivos ligado à síntese de novos compostos é a sua aplicação numa dada actividade, principalmente biológica. Em vários casos busca-se na natureza compostos activos, por técnicas de extracção e isolamento, ou sintetizam-se análogos de estruturas naturais. Existem, no entanto, também estruturas totalmente sintéticas, em que se investiga uma dada estrutura e se efectua a sua derivatização para a melhoria de uma dada actividade através do design racional de fármacos ou o estudo de relações estrutura actividade. Os compostos antimicrobianos denotam esta mesma evolução na ciência. O conceito antimicrobiano referia-se a conjuntos de compostos de origem em microrganismos que tinham a capacidade de inibir ou aniquilar outros microrganismos. Actualmente este termo designa também compostos de origem sintética ou semi-sintética com a mesma acção. [17,18]

A necessidade de novos antibióticos é emergente. Embora tenham sido introduzidos no mercado novos agentes antimicrobianos, estes não são suficientes dada a corrente disseminação de bactérias multirresistentes assim como a preocupação com a segurança biológica. Este facto guia a contínua e intensiva investigação na busca de novos compostos antimicrobianos. A multirresistência é uma enorme preocupação o que também guia a procura de estruturas que apresentem num mecanismo de acção distinto que contorne esta problemática. [17]

Uma outra problemática associada aos microrganismos está a sua utilização como agentes de bioterrorismo e serem utilizados como armas destrutivas. Este um problema social dado que a sua utilização tem duas acções diferenciadas, sendo a destruição a vidas pela sua interacção com os indivíduos como também, pelo conhecimento por parte da população da sua potencial ameaça, leva a pânico social. Aqui se encontra também uma importante justificação para a procura de novos fármacos que possam controlar estas ameaças, dado ainda ser um ponto de maior fragilidade na sociedade corrente. [14]

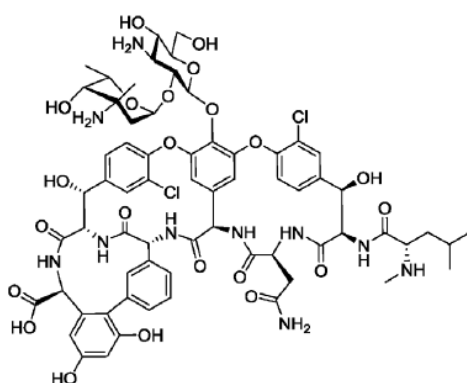


Figura 6| Vancomicina: antibiótico derivado de um glicósido [17]

1.3.1| Glicósidos como antibióticos

Actualmente os carbo-hidratos aplicados como agentes antimicrobianos são de origem natural ou semi-sintética, havendo um leque alargado de compostos. Exemplo dos mesmos é a família dos aminoglicósidos e a família dos glicopéptidos. Esta segunda é caracterizada pela presença de um mono- ou dissacárido *O*-glicosilado a de um péptido cíclico em uma ou mais posições do mesmo, sendo exemplo a vancomicina que é extraída da *Amycolatopsis orientalis* (figura 6). A vancomicina enquadra-se nas opções de tratamento contra bactérias Gram-positivas, sendo estas bastante propícias ao desenvolvimento de multirresistência e aquelas que mais necessitam da criação de novos fármacos. O mecanismo de acção da família do referido antibiótico caracteriza-se pela interacção com a membrana celular e inibição da ligação das peptidoglicanas ao enzima. Este antibiótico revelou uma potente actividade contra *Staphylococcus aureus* e a espécie *Enterococcus*, no entanto ocorreu já o desenvolvimento de resistência pelo que se desenvolveram outras moléculas derivadas desta com uma melhor actividade.[17]

É possível encontrar estruturas glicosídicas com posições desoxigenadas em alguns antibióticos com um largo espectro de aplicação, tendo como exemplo infecções respiratórias e dos tecidos moles. Neste campo tem-se os macrolídeos que consistem em lactonas macrocíclicas *O*-glicosiladas a desoxiglicósidos em uma ou mais posições. A Eritromicina é um exemplo desta classe de compostos usada como alternativa à penicilina. Esta molécula originou novos desenvolvimentos estruturais originando uma família de compostos com actividade contra bactérias Gram-positivas [17].

A vantagem associada ao carbo-hidratos que leva à sua abordagem para aplicação antimicrobiana deve-se à sua presença biológica. Estes estão envolvidos em processos de reconhecimento intercelular e estão presentes nas paredes celulares de fungos e bactérias. A abordagem racional leva ao envolvimento de carbo-hidratos em estruturas activas que se ligam naturalmente a enzimas devido ao seu envolvimento natural em processos de reconhecimento celular, especificidade para um dado alvo ou presença na parede celular. Ao serem naturalmente reconhecidos pode levar a uma maior facilidade de contornar o desenvolvimento de multirresistência e se conseguir obter novos fármacos de actividade melhorada. [17,18]

1.3.1.1/ Glicósidos como surfactantes

A membrana celular dos microrganismos é uma importante componente em vários tipos de mecanismos de acção de antibiótico dado ser a barreira que os protege. Existem antibióticos cujo objectivo é solubilizarem-se pela membrana para o interior da célula, noutros casos, o seu mecanismo de acção consiste em perturbar a organização membranar ou de dadas estruturas presentes na mesma, como as proteoglicanas. Este facto leva à inserção de uma outra temática que são os surfactantes e os glicósidos tensioactivos. Os surfactantes de origem em glicósidos apresentam uma cabeça hidrofílica (açúcar) ligada a uma estrutura hidrofóbica derivada de um álcool ou ácido gordo. A sua natureza anfifílica permite a formação de agregados moleculares e assim interagir com a membrana ou trespassá-la para o interior da célula. A investigação deste tipo de surfactantes, que podem ser iónicos ou não-iónicos é potenciada por estes serem facilmente biodegradáveis, não agressivos para aplicação na pele e poderem ser obtidos de formas amigas do ambiente. Logo a sua não toxicidade e a sua fácil obtenção tem focado a atenção na sua investigação como agentes antimicrobianos. [19]

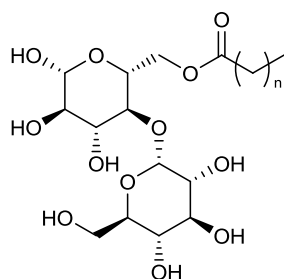


Figura 7| Exemplo de um glicósido surfactante

Consoante o mecanismo de acção, estão presentes duas valências, por um lado a parte hidrofílica faculta a possibilidade de se ligar à membrana, enquanto que a porção lipofílica permite a penetração da membrana. Aprofundando esta temática, sabe-se que determinados surfactantes perturbam a membrana lipídica devido a sua capacidade de dissolução no meio extracelular e membranar, alterando a tensão superficial desta e permitindo que a água entre no interior da célula e ocorra a lise bacteriana. Em outros casos, o alvo está no interior da célula, ou seja, esta apresenta determinada selectividade para uma dada estrutura que possa estar presente no surfactante derivado de glicósido e que condicionado pela sua propriedade permite a sua entrada para o meio intracelular. [17]

Os derivados de glicósidos aqui apresentados são exemplo de surfactantes e este facto impeliu ao seu estudo e à investigação das suas propriedades tensioactivas e do mecanismo de acção que baseia a sua actividade. Pretende-se futuramente desvendar a ligação entre estes dois parâmetros aqui tão importantes. Os estudos existentes são preliminares mas o facto

destas estruturas poderem formar agregados micelares poderá vir a indicar se a sua actividade passa pela interacção com a membrana, através da sua perturbação ou se passa pela penetração para o meio intracelular e aí interagir com um determinado receptor. [5,6] O conceito de tensão superficial será posteriormente abordado. Os resultados até agora existentes permitem a conclusão que o padrão de oxigenação da glícona são determinantes dado que a existência do grupo hidrometilo anula a actividade, bem como a protecção por acetilação dos grupos hidroxilo. Pretende-se futuramente analisar se a posição dos hidroxilos influi também a sua actividade. A estrutura lipofílica é também fundamental pois a dimensão da cadeia hidrocarbonada diferencia o potencialidade do composto como antimicrobiano. Estas modificações estruturais alteram as propriedades tensioactivas da molécula o que poderá reforçar a indicação de como esta é uma importante propriedade quando se aborda a temática de bioactividade contra as espécies de *Bacillus* com especial foco para o *B. anthracis*. [14]

1.3.2| Antrax – *Bacillus anthracis*

Bacilo é a designação geral das bactérias pertencentes ao género *Bacillus*, sendo caracterizadas pela forma bastonete. Podem ser gram-positivas ou gram-negativas, embora os resultados mais promissores deste tipo de compostos seja nas bactérias gram-positivas. Esta última classificação advém da constituição da parede celular do organismo, que condiciona o tipo de condições patogénicas e os antibióticos que neles actuam. [18] A principal actividade biológica dos compostos-tipo em estudo revelou ser contra os *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, e tendo em vista a sua aplicação contra *B. anthracis* [5,6]. Estes bacilos pertencem ao filo *Firmicutes*, são também aeróbios e anaeróbios facultativos, apresentando uma estrutura de bastonete espiralado e com a capacidade de produzir esporos termo-resistentes. Encontram-se no solo o que leva à contaminação de vários alimentos, levando a problemas no tracto gastro-intestinal. [20] As características fenotípicas desta espécie são semelhantes o que leva a sua aproximação com *B. anthracis*, podendo ser feitos estudo prévios com outras bactérias da espécie para se seleccionar os candidatos mais promissores a actuarem como fármacos.

Desde a Antiguidade até ao século XX, as infecções naturais por *B. anthracis* levaram à morte de milhares de animais e humanos. As suas propriedades permitiram o seu uso como agente biológico de acção bélica desde a II Guerra Mundial, sendo que no período de 1978 a 1979 o governo da Rodésia utilizou o antrax contra o seu próprio povo matando gado e centenas de pessoas. Em 2001, reduzidas gramas de endoesporos concentrados de antrax foram entregues pelo correio numa acção de bioterrorismo nos Estados Unidos da América

resultando na morte de cinco dos vinte e dois infectados. Este bacilo é considerado um assassino invisível e silencioso, sendo o risco de mortalidade alto aquando da infecção, sendo possível a sua produção, com reduzido custo, por indivíduos não especializados. O antrax é uma ameaça real num futuro expectável, sendo de primordial importância o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos com novos mecanismos de acção para contornar a possível resistência dos actuais agentes antimicrobianos em uso devido não só a sua restência como também a sua ameaça como agente de bioterrorismo. Antrax é uma patologia aguda altamente letal causada pela acção do *Bacillus anthracis*, que afecta tanto humanos como animais. O principal veículo de infecção consiste na inalação, ingestão ou contacto através da pele com os endoesporos de *B. anthracis*, que apresentam a capacidade de sobreviver em condições adversas durante décadas. [21,22] Todas estas características focam a necessidade de se encontrarem novos fármacos activos, que contornem a resistências aos actuais e possam mesmo vir a ter uma acção preventiva, de forma que a sociedade actual possa mesmo ter uma noção de segurança quanto a esta patologia e agente infeccioso.

1.4| Tensão superficial



Figura 8| Bola de sabão e água

Porque será que um mosquito se consegue sustentar à tona da água? Porque é que uma criança se consegue fascinar com as suas bolas de sabão (figura 8)? E porque não o consegue fazer apenas com água? Qual a propriedade física que o permite fazer? Estas são algumas das questões que se podem colocar para obtermos uma mesma resposta: A chave está na tensão superficial. A tensão superficial é uma propriedade física associada a interfaces está relacionada com as forças atractivas entre moléculas. A tensão superficial resulta assim do desequilíbrio de forças atractivas que actuam nas moléculas. No interior do líquido estas são afectadas pelas mesmas forças atractivas em todas as direcções, logo a força resultante destas interacções é nula. Na superfície estas estão diferenciadas dado que uma das direcções está deficitária, ou seja, existe uma atracção exercida pelas moléculas do interior do líquido e pelas moléculas que se situam na lateral, não se verificando uma equivalência pelas moléculas superiores que são de uma fase distinta (gasosa) como se verifica na figura 9. Existe assim uma assimetria de forças que origina a tensão superficial. Este facto leva à existência de uma força resultante direccionada para o interior do sistema, sendo reflexo das forças coesivas do líquido. Assim sendo esta coesão entre as moléculas cria uma força tangencial à superfície, podendo-se concluir que a tensão superficial se correlaciona com a energia coesiva do líquido (figura 5). A superfície líquida irá comportar-se como uma membrana elástica que engloba e que comprime o sistema que se encontra por baixo. [23]

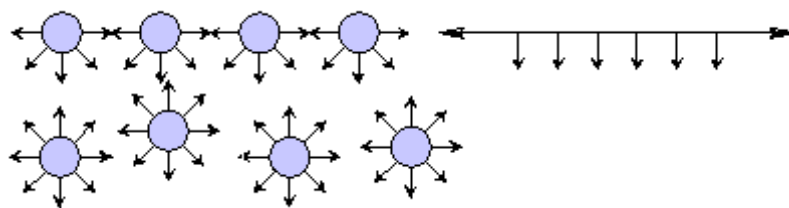


Figura 9| Esquema ilustrativo das forças de interacção entre as moléculas no líquido e da força tangencial à superfície

A tensão superficial é expressa como uma força por unidade de comprimento, mais usualmente em miliNewton por metro (mN.m^{-1}), ou seja, equivale ao torque provocado por uma força de um miliNewton exercida à distância de um metro do ponto de rotação. É de referir que a tensão superficial é equivalente à energia superficial, o que pode levar a que esta grandeza seja expressa em unidades de energia. A energia de coesão das moléculas está

correlacionada com a função das forças de dispersão do líquido. Tendo como exemplo a tensão superficial a 25 °C da água (72 mN.m^{-1}) e do n-dodecano (25 mN.m^{-1}) verifica-se que há uma relação com a polaridade da molécula, quanto mais polar é a molécula maior é a sua tensão superficial. Outro factor de dependência é o volume livre do líquido, dado que quanto maior é o volume livre, mais baixo é a energia de coesão e logo mais baixa é a tensão superficial. [24]

1.4.1| Medição da Tensão superficial

O método mais usual de medição da tensão superficial é o Método do Anel em que a superfície está em equilíbrio. Este procedimento consiste na imersão de um anel de platina sendo medida a força necessária para puxar o anel através da superfície. O método baseia-se na existência da interface entre os dois meios, gasoso e líquido. A sonda, neste caso o anel, está suspensa numa balança de precisão. O sistema baixa o braço ligado ao anel até encontrar a interface, dado que detecta o diferente sistema. A sonda exerce uma dada força sobre a superfície até que se forme uma membrana, sendo medida a força necessária para mover a sonda nesta membrana, sem a destruir. Para a estrutura sob a forma de anel a tensão superficial será obtida através da divisão da força F pelo perímetro médio do anel. [23, 24]

Actualmente o cálculo dos valores de tensão superficial é efectuado de forma automática por tensiómetros, neste caso um Processor Tensiometer K100 da Kruss, tornando a técnica de medição através de balanças analíticas obsoleta. O uso da balança antecede o uso do tensiómetro, em que se usavam pesos para determinar qual a massa necessária para quebrar o filme formado. O método mais usual actualmente pelo qual se determinam as medidas de tensão superficial recorre ao uso de um anel feito de platina e de irídio, denominado anel de Du Noüy. Esta técnica é mais vantajosa comparativamente ao uso de placa, entre as quais o facto de ser utilizada há mais tempo, o que facilita a comparação com outros trabalhos experimentais. Outra das vantagens deve-se ao facto do perímetro do anel ser superior ao comprimento da placa rectangular e, consequentemente, a sensibilidade na determinação da será maior. Uma das desvantagens é a formação de um menisco que implica a introdução de correcções face aos valores tabelados à temperatura de medição. [23]

A medição da tensão superficial implica que haja uma correcção dos valores obtidos dado que a curva do filme que se forma é superior no interior do anel comparativamente ao exterior, logo a força máxima, onde o ângulo de contacto é zero, é alcançada em diferentes distâncias da superfície. Na análise aqui aplicada usa-se o método de correcção de *Harkins & Jordan*. Foram elaboradas tabelas de valores correctivos por determinação das diferentes

tensões superficiais utilizando anéis de diferentes diâmetros, sendo convencionado que este é o método mais preciso. [24]

1.4.2| Surfactantes

A interacção dos potenciais fármacos com a membrana celular representa um papel fundamental na sua actividade em vários aspectos, podendo ser através do bloqueio de permeabilidade, indução da ruptura de membrana/solubilização, lise ou difusão assistida, acompanhados ou não com modificação estrutural durante o transporte através de alvos intracelulares. Assim a penetração da primeira barreira, a membrana celular, ou a sua perturbação pode determinar a actividade do fármaco. Consequentemente o teste para eventuais correlações entre a superfície e a actividade antimicrobiana pode dar importantes clarificações associadas ao mecanismo de acção dos fármacos. Uma molécula com propriedades surfactantes pode ser um importante factor para apresentar actividade biológica. A capacidade de um fármaco atingir um dado alvo pode ser determinante pelas suas capacidades de transpor ou se relacionar com as membranas. Assim importante aqui clarear este termo.

Surfactante é um termo abreviado de agente superficial activo denotando a sua actividade na superfície, que implica que uma das fases da interface é um gás. Os surfactantes são moléculas anfifílicas, que apresentam uma parte apolar (hidrófoba ou lipofílica) e uma parte polar (hidrofílica) ligadas entre si. A classificação dos surfactantes depende da parte polar da molécula, podendo ser iónicos, quando apresentam carga eléctrica ou não iónicos, na ausência de carga eléctrica. A parte apolar costuma ser constituída por cadeias alquílicas. Os compostos aqui apresentados são do tipo não iónicos derivados de glicósidos ligados a cadeia alifáticas derivadas de álcoois. Quando em solução aquosa de um agente tensioactivo, parte das moléculas encontra-se sob a forma de monómeros dentro da solução, enquanto que parte encontra-se na interface líquido-gás sob a forma de uma monocamada. Neste situação todas as moléculas se encontram em equilíbrio e a cada concentração do composto em estudo corresponde um valor característico de tensão superficial. Quando essa concentração atinge um valor crítico, os monómeros começam a associar-se em agregados micelares. As micelas são agregados coloidais termodinamicamente estáveis, formadas de forma espontânea acima de uma dada concentração, designada por concentração micelar crítica (CMC). Nos casos comuns, a CMC irá diminuir com o aumento da cadeia lipofílica, isto porque as interacções hidrofóbicas são maiores, logo a agregação micelar irá ocorrer mais cedo. A CMC é muito menor para tensioactivos não iónicos quando comparada com os iónicos. A sua estrutura é

determinante no tipo de agregado que se forma, devido ao rearranjo espacial que ocorre e à sua capacidade de empacotamento e de interacção entre si. [23]

A classificação de surfactante associada aos compostos aqui em estudo é uma ferramenta bastante útil que poderá vir a fornecer instruções fundamentais na determinação do mecanismo de acção dos 2-desoxiglicósidos aqui referidos levando a futuramente se determinar as estruturas mais promissoras com a acção antimicrobiana contra *Bacillus*.

1.5| Plano de Síntese (Confidencial)

2|APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

2| APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS (CONFIDENCIAL)

3|CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

3 | CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS (CONFIDENCIAL)

4|PARTE EXPERIMENTAL

4| PARTE EXPERIMENTAL

4.1| Materiais e Métodos

4.1.1| Instrumentação

As pesagens foram efectuadas numa balança digital analítica de marca *KERN ALJ*, modelo 220-4, com uma precisão $\pm 10^{-4}$ g.

As reacções promovidas pela irradiação de microndas foram realizadas com recurso ao forno de micro-ondas de modelo Discover SP System w/Activent 909155 da marca *CEM-QLABO*, operando com recurso ao *software* Synergy TM Application Software.

A caracterização experimental realizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi efectuada com recurso a um aparelho BRUKER Avance 400, no qual foram obtidos os espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN a uma frequência de 400,13 MHz e a 100,62 MHz respectivamente, à temperatura de 25 °C. Os compostos foram sujeitos a ensaios de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HMQC e HMBC, utilizando-se como solventes deuterados para preparação das amostras clorofórmio-d (CDCl_3) e acetona- d_6 (ace d_6). Os valores de desvio químico, δ , são expressos em ppm e as constantes de acoplamento em Hz.

Os espectros de massa de alta resolução foram adquiridos num espectrómetro de massa Apex Ultra da Bruker Daltonics equipado com um magneto supercondutor de 7 tesla e com fonte de ionização por *electrospray*. As amostras foram dissolvidas em metanol grau HPLC, Panreac, e injectadas directamente com recurso a uma bomba de seringa da KD Scientific a um fluxo de $120 \mu\text{L.h}^{-1}$.

Foram ainda determinados os pontos de fusão, de todos os compostos sólidos, recorrendo ao aparelho melting point apparatus, Stuart Scientific SMP3 e utilizando tubos capilares com uma rampa de aquecimento de $1,5 \text{ }^\circ\text{C/min}$. As rotações específicas $[\alpha]_{\text{D}}^{20.0}$ foram obtidas usando o polarímetro Perkin Elmer 343 a uma temperatura de 20 °C e operando a um comprimento de onda de 589 nm, com uma concentração de 10 mg/ml e com um percurso óptico de 1 cm.

Quando necessário foi utilizado um banho de ultra-sons *VWR™ Ultrasonic Cleaner* para promover a dissolução dos compostos. Foi utilizado um agitador mecânico em algumas reacções da marca VWR VOS 14.

As soluções foram concentradas com recurso a três diferentes evaporadores rotativos da marca *Büchi* (*modelo Rotavapor® R111 e modelo Rotavapor® R200*), à temperatura de 40 °C

e em vários graus de pressão reduzida, definidos segundo o solvente ou mistura de solventes utilizados.

As medidas de tensão superficial foram efectuadas no Tensiómetro K100MK2 da marca Krüss. As pesagens dos compostos para a preparação das soluções deste estudo foram neste caso efectuadas numa balança digital da marca Mettler Toledo, modelo AX 205 (precisão $\pm 10^{-5}$ g). A dissolução dos compostos foi realizada com o auxílio de um banho de ultra-sons da marca Elma Transsonic, modelo 420

4.1.2| Técnicas de Separação e purificação

O acompanhamento das reacções foi realizado por cromatografia em camada fina (TLC) em placas de sílica gel (Ref. 60 F254-Macherey Nagel) com detecção por luz UV e revelação promovida por uma solução de ácido sulfúrico e metanol (10%), seguida do aquecimento com uma pistola de ar quente a 120 °C. Quando necessário foi efectuada a purificação dos compostos, realizada por cromatografia em coluna, sendo a fase estacionária constituída por sílica gel 60A (0,040-0,063 mm, Ref. SDS *Specialiste des Solvants*).

4.1.3| Reagentes, Produtos e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados na execução deste trabalho experimental foram adquiridos comercialmente (VWR, Alfa Aesar, Panreac, Sigma-Aldrich) com um grau de pureza acima de 99% segundo a rotulagem, sem qualquer purificação adicional. Em determinados passos reaccionais foram destilados e secos com peneiros moleculares activados (dim. 4Å e 3Å para o metanol) num período superior a 24h. Quando necessário procedeu-se à secagem dos reagentes sólidos em pistola de secagem Büchi Glassoven B-585 à temperatura de 120 °C em sistema de vácuo.

4.2| Síntese dos Compostos Estudados (Confidencial)

5|REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lindhorst, T., *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Hamburg, Willey-VCH, 2000
2. Davis, B.G., Fairbanks, A.J.; *Carbohydrate Chemistry*; New York; Oxford Higher Education; 2006
3. Collins, P. and Ferrier, R. *Monosacharides - Their Chemistry and Their Roles in Natural Products* **1995**. John Wiley and Sons.
4. SPQ, *Nomenclatura de Hidratos de Carbono*, **2012**, Lisboa,
5. Silva, F., Goulart, M., Justino, J., Neves, A., Santos, F., Caio, J., Lucas, S., Newton, A., Sacoto, D., Barbosa, E., Santos, M. S., Rauter, A. P., *Bioorg. Med. Chem.* 16 (**2008**) 4083-4092
6. Rauter, A. P, Lucas, S., Almeida, T., Sacoto, D., Ribeiro, V., Justino, J., Neves, A., Silva, F. V. M., Oliveira, M. C., Ferreira, M. J., Santos, M. S., Barbosa, E., *Carbohydrate Research*. 340 (**2005**) 191-201
7. Rauter, A. P., Almeida, T., Vicente, A. I., Ribeiro, V., Bordalo, J.C., Marques, J.P., Ribeiro, F.R., Ferreira, M.J., Oliveira, C., Guisnet, M.; *Journal of Organic Chemistry*, (**2006**) 2429-2439
8. Matsumura, S, Kawamura, Y., Yoshikawa, S., Kawada, K.; *American Oil Chemists' Society*, 70 (**1993**) 17-23
9. Madhusuda, S., Agnihotri, G., Negi, D., Misra, K., *Carbohydrate Research* 340 (**2005**) 1373-1377
10. Jung, M., Lee, Y., Moon, H., Jung, Y., Jung., H., Oh, M., *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (**2009**) 3120-3129
11. Yadav, J. S., Reddy, B. V. S., Reddy, B. K., Satyanarayana, M., *Tetrahedron Letters*, 43 (**2002**) 7009-7012
12. Maeda, N., Kokai, Y., Ohtani, S., Sahara, H., Hada, T., Ishimaru, C., Kuriyama, I., Yonezawa, Y., Iijima, H., Yoshida, H., Sato, N., Mizushima, Y., *Nutrition and Cancer*, 57 (**2007**) 216-223

13. Nowacki, A., Walczak, D., Liberek, B., *Carbohydrate Research*, 352 (2012) 177-185
14. A. P. Rauter, A. Martins, J. Caio, J. P. Pais, P. Serra, M.- S. Santos, A. Pelerito, J. P. Gomes, J. Justino, R. Dias, R. Tenreiro, *Sugar derivatives as inhibitors of Bacillus species, process for their preparation and utilization* (Compostos derivados de açúcar inibidores de espécies de Bacillus, processo de obtenção e respectivas utilizações), PCT/IB2012/050123, submetida a 2012.
15. Siegbahn, A., Aili, U., Ochocinska, A., Olofsson, M., Ronnols, J., Mani, K., Widmalm, G., Ellervik, U., *Biorganic & Medicinal Chemistry*, 19 (2011) 4194-4126
16. Abrahamsson, C., Ellervik, U., Eriksson-Bajtner, J., Jacobsson, M., Mani, K., *Carbohydrate Research*, 343 (2008) 1473-1477
17. Xavier, N., Rauter, A.P., *Pure and Applied Chemistry*, 84 (2012) 803-816
18. Patrick, G., *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 4th edition, New York, Oxford University Press, 2009
19. Bazito, R., Seoud, E., *Journal of Surfactants and Detergents*, 4 (2001) 395-400
20. Vilas-Bôas, G.T., Peruca, A.P.S.; Arantes, O.M.N., *Canadian Journal of Microbiology* 53 (2007) 673-685
21. Pilo, P., Frey, J., *Infection, Genetics and Evolution*, 11 (2011) 1218-1224
22. Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. and Kolsto, A. B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - One species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2000) 2627-2630.
23. Kronberg, Jönsson, *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, London, Willey-VCH, 1998
24. Adamson, Arthur, *Physical Chemistry of Surfaces*, 5th Edition, New York, Willey-VCH, 1990
25. Krüss, *Tensiometer K100 MK2/SF/C – Instruction Manual*, Hamburg 2001-2005
26. Adinolfi, M., Iadonisi, A., Ravidá, A., *Tetrahedron Lett*; 44 (2003) 7863-7866
27. Hunsen, M., Long, D.A., Ardenne, C., Smith, A.; *Carbohydrate Research* 340 (2005) 2670-2677
28. J. Zhao, S. Wei, X. Ma, H. Shao; *Carbohydrate Research* 345(2010) 168-171
29. Somsák, L., *Chemical Reviews*, 101 (2001), 81

30. Solomons, T.W.G., Fryhle, C.B., *Organic Chemistry*, 9th edition, 2007, New York, John Wiley and Sons
31. Silverstein, R., Webster, F.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds*; 6th Edition, 1998, New York, John Wiley and Sons
32. Serra, P., *Relatório de Projecto de Licenciatura*, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2010, Lisboa
33. Zhang, H., Zhan Z., Cai, X., Patente n.º CN102108089-A, 29 Junho 2011
34. Gottlieb, H., Kotlyar, V., Nudelman, A., *Journal of Organic Chemistry*, 62 (1997) 7512-7516
35. Ernst, B., Hart, G.W., Sinaÿ, P., *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part I*, 2000, Willey- VCH
36. Name Reactions: Ferrier glycal allylic rearrangement, <http://www.springerlink.com/content/nn012002652362t7>, consultado em 25 de Setembro de 2012
37. Lee, S.D.; Falck, J.R., *American Chemical Society*, 55 (1990) 5812
38. Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B., Westman, J., *Tetrahedron*, 57 (2001) 9225-9254
39. Morris, W., Shair, M., *Organic Letters*, 11 (2009) 9-12
40. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, in *Seventh Edition: Approved Standard M7-A7* 2005, CLSI: Wayne, PA, USA.
41. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*, in *Proposed Guideline M45-P*. 2006, CLSI: Wayne, PA, USA.

ANEXOS (CONFIDENCIAL)